

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.009

· 基础研究 ·

双氢青蒿素诱导外周 T 细胞淋巴瘤 Hut-78 细胞凋亡及其可能的机制

黄琰, 吴隼, 张媛, 字友梅, 杨满, 郭燕, 张灵秀, 王莉华(新乡医学院第一附属医院 血液科, 河南 卫辉 453100)

[摘要] **目的:**考察双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)诱导的外周 T 细胞淋巴瘤 Hut-78 细胞凋亡,并进一步研究其作用机制。**方法:**CCK-8 法检测 1~30 $\mu\text{g/ml}$ DHA 对 Hut-78 细胞增殖的影响,运用 Hoechst 33258 染色技术在共聚焦显微镜下观察 DHA 对 Hut-78 细胞核形态的影响,流式细胞术检测 DHA 对 Hut-78 细胞凋亡的影响,10 mmol/L 的活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理细胞 1 h,观察 ROS 在 DHA 引起的细胞线粒体膜电位变化中的作用,Western blotting 检测在 Hut-78 细胞凋亡过程中 ROS 对 DHA 引起的细胞色素 C 释放的影响。**结果:**DHA 呈浓度依赖性抑制 Hut-78 细胞的增殖,并引起细胞核固缩,形成凋亡小体。5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ DHA 引起的细胞凋亡率分别为(25.1 \pm 2.8)%、(43.6 \pm 3.1)%、(68.9 \pm 2.6)%,与对照组相比差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。20 $\mu\text{g/ml}$ DHA 处理导致 Hut-78 细胞线粒体膜电位下降(59.4 \pm 2.6)%,而经 ROS 抑制剂 NAC 预处理之后,线粒体膜电位下降(38.4 \pm 2.1)%。DHA 能够引起线粒体中细胞色素 C 的释放,而 NAC 的预处理能够明显地抑制这一过程,统计结果进一步证明这一点。**结论:**DHA 能够抑制外周 T 细胞淋巴瘤 Hut-78 细胞的增殖并诱导细胞凋亡,其作用机制可能与 DHA 促进 ROS 依赖的细胞色素 C 释放有关。

[关键词] 双氢青蒿素;外周 T 细胞淋巴瘤;Hut-78 细胞;细胞凋亡;活性氧;细胞色素 C

[中图分类号] R733.1; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0057-05

Dihydroartemisinin induced apoptosis of peripheral T lymphocytoma Hut-78 cells and its possible mechanism

HUANG Yan, WU Sun, ZHANG Yuan, ZI Youmei, YANG Man, GUO Yan, ZHANG Lingxiu, WANG Lihua (Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui 453100, Henan, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate dihydroartemisinin (DHA)-induced apoptosis of peripheral T lymphocytoma Hut-78 cell line and its possible mechanism. **Methods:** The effect of DHA 1–30 $\mu\text{g/ml}$ on proliferation of Hut-78 cells was measured by CCK-8 assay. The morphological changes of Hut-78 cell's nuclei induced by DHA were observed by Hoechst 33258 staining and confocal microscopy. Flow cytometry was used to examine the apoptosis of Hut-78 cells induced by DHA. After pretreating the Hut-78 cells with 10 mmol/L of reactive oxygen species (ROS) scavenger N-acetyl cysteine C (NAC), a role of ROS in changes of mitochondrial membrane potential induced by DHA was evaluated. Effect of ROS on release of cytochrome C induced by DHA during apoptosis of Hut-78 cells was examined with an immunoblotting assay. **Results:** DHA inhibited proliferation of the Hut-78 cells in a dose-dependent manner, induced nucleus pyknosis and formed apoptotic bodies in the cells. Apoptosis rates of the Hut-78 cells induced with 5, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ of DHA were (25.1 \pm 2.8)%, (43.6 \pm 3.1)% and (68.9 \pm 2.6)% respectively, which were significantly different from that of the control group (all $P < 0.01$). Furthermore, treatment with 20 $\mu\text{g/ml}$ of DHA dropped mitochondrial membrane potential of the Hut-78 cells by (59.4 \pm 2.6)%, and pretreating with ROS scavenger NAC dropped the mitochondrial membrane potential by (38.4 \pm 2.1)%. DHA can induce release of cytochrome C in mitochondrion, which can be significantly inhibited by pretreatment with NAC. Statistic results further demonstrated this point. **Conclusions:** DHA can effectively inhibit proliferation of the peripheral T lymphocytoma Hut-78 cells and induce their apoptosis. Its action mechanism may be related to ability of HAD to promote release of ROS-dependent cytochrome C.

[基金项目] 河南省教育厅基金资助项目(No. 2006320039)。Project supported by the Foundation from the Bureau of Education of Henan Province (No. 2006320039)

[作者简介] 黄琰(1976–),女,山东菏泽人,副主任医师,副教授,主要从事白血病的免疫治疗研究,E-mail:huangydoctor@163.com

[通信作者] 黄琰(HUANG Yan, corresponding author),E-mail:huangydoctor@163.com

[**Key words**] dihydroartemisinin (DHA); peripheral T cell lymphoma; Hut-78 cell; cell apoptosis; reactive oxygen species (ROS); cytochrome C

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 57-61. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.009]

外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T cell lymphoma)是一种起源于成熟 T 细胞或者胸腺后 T 细胞及自然杀伤细胞的恶性肿瘤。全世界范围内总的发病率较低,约占非霍奇金淋巴瘤的 7%。外周 T 细胞淋巴瘤的重要特点是恶性程度高,临床多表现为结外病变合并淋巴结病变,结外病变多见于皮肤、肝、脾、骨及神经系统^[1]。目前化疗仍然是外周 T 细胞淋巴瘤的主要治疗手段,由环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和强的松组成的 CHOP 方案常常被用作其一线治疗药物,但缓解期短,效果不佳^[2]。因此,寻找新的有效治疗药物已是临床所面临的一大挑战。青蒿素是我国传统抗疟疾的中药^[3,4]。双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是青蒿素在体内的主要活性代谢产物,其抗肿瘤活性是青蒿素类药物(DHA、青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚)中最高的^[5-7]。最近发现 DHA 具有许多药理活性,如抗血吸虫、免疫调节和抗肿瘤活性等^[8-10],而其抗肿瘤活性为研究的热点,大量研究已经证实 DHA 对多种肿瘤具有抑制作用,如鼻咽癌、肝癌、乳腺癌。目前 DHA 对外周 T 细胞淋巴瘤的杀伤作用及其机制的研究较少。本研究以 DHA 作用于外周 T 细胞淋巴瘤 Hut-78 细胞,观察 DHA 对 Hut-78 细胞凋亡的影响,并对其机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

DHA(纯度为 99%)购自西安乐森生物有限公司, RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,新生牛血清购自杭州四季青公司,胰蛋白酶购自华美生物公司; CCK-8 试剂盒购自碧云天公司, DMSO、Rhodamine 123、Hoechst 33258、FITC/PI 双染试剂盒和 N-乙酰半胱氨酸(NAC)均购自 Sigma 公司;一抗为鼠单克隆抗体(抗细胞色素 C),二抗为荧光标记的抗鼠单克隆抗体,均购自美国 CST 公司。酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司,共聚焦显微镜购自奥林巴斯公司,流式细胞仪购自贝克曼公司。

1.2 细胞培养及活性检测

外周 T 细胞淋巴瘤 Hut-78 细胞购买于中国科学院上海细胞库。Hut-78 细胞为淋巴样人皮肤 T 淋巴瘤,源于赛塞利(Sezary)综合征患者 T-细胞淋巴瘤细胞,具有辅助/诱导物表型成熟 T-细胞的特

征。细胞为贴壁细胞,常规培养。

将对数生长期的细胞以 $10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl 细胞混悬液。培养 24 h 后,换掉旧培养液,加入含 1、2、5、10、20、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DHA 的培养液继续培养 24 h,弃掉培养液,加入含 10% CCK-8 试剂的培养液放培养箱中孵育 20 ~ 30 min,置酶标仪中检测 450 nm 处的光密度(D)值, D_{450} 值与细胞活性成正比,因此以 D_{450} 值代表细胞活性。

1.3 Hoechst 33258 染色法观察 DHA 对 Hut-78 细胞细胞核形态的影响

5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DHA 处理 Hut-78 细胞 24 h 后, PBS 清洗 3 次,加入终浓度为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Hoechst 33258 染色 20 min, PBS 轻轻清洗 3 次,在共聚焦荧光显微镜下观察细胞核的形态。激发光源为汞灯。

1.4 流式术检测 DHA 对 Hut-78 细胞凋亡的影响

采用流式术 FITC-Annexin V/PI 双染法。Hut-78 细胞接种到 12 孔板,每孔约 1×10^6 个。细胞经过 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DHA 处理 24 h,加入 5 μl 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 FITC-Annexin V 避光温育 30 min,然后加入 PI 避光温育 10 min。用 300 目筛子过滤细胞,流式仪检测,通过仪器自带软件分析细胞中 FITC 和 PI 的荧光百分率,计算细胞凋亡率。光源为 488 nm 波长氩离子激光器,每份标本收集 10 000 个细胞。

1.5 DHA 对 Hut-78 细胞线粒体膜电位的影响

10 mmol/L 的 NAC 预处理细胞 1 h 后, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DHA 处理 Hut-78 细胞 24 h,然后采用线粒体膜电位特异性探针 Rhodamine 123 对细胞进行染色, PBS 洗 3 次,加入终浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Rhodamine 123 避光染色 20 ~ 30 min, PBS 轻轻洗 3 次,在流式仪检测细胞中 Rhodamine 123 的荧光量。激发光为氩离子激光器发射的 488 nm 激光。线粒体膜电位(%) = 膜电位探针荧光量/总的荧光量 $\times 100\%$, 线粒体膜电位下降百分率(%) = (空白对照组线粒体膜电位 - 实验组线粒体膜电位) $\times 100\%$ 。

1.6 Western blotting 检测 DHA 对 Hut-78 细胞内细胞色素 C 表达的影响

10 mmol/L 的 NAC 预处理细胞 1 h 后, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DHA 处理 Hut-78 细胞 24 h,收集细胞,提取细胞总蛋白,酶标仪检测蛋白质浓度,再将蛋白进行 SDS-PAGE,转膜、脱脂奶粉封闭,依次加入鼠单抗(抗细胞色素 C)和带荧光的抗鼠多抗,用 Western

blotting 自动分析仪检测荧光并用 Image J 软件进行灰度定量分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 DHA 对 Hut-78 细胞增殖的影响

1、2、5、10、20、30 $\mu\text{g/ml}$ 6 个浓度组的细胞活性分别为(91.5 \pm 2.4)%、(86.1 \pm 3.1)%、(76.8 \pm 1.5)%、(57.5 \pm 1.9)%、(30.6 \pm 2.4)%、(17.3 \pm 1.6)% ,随着 DHA 浓度的增加,Hut-78 细胞活性随之降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1),表明 DHA 对 Hut-78 细胞的抑制作用呈浓度依赖性。

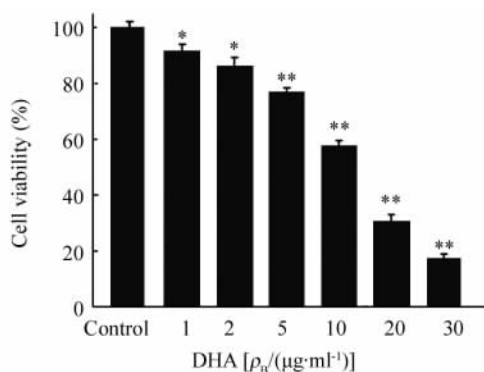


图 1 不同浓度 DHA 对细胞活性的影响
Fig. 1 Cell viability induced by different concentration of DHA

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 DHA 能够诱导 Hut-78 细胞凋亡

共聚焦荧光显微镜下观察细胞核形态(图 2) 见,5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ DHA 处理 24 h 后,细胞核出现不同程度的固缩,并出现凋亡小体(图中白色箭头所指),20 $\mu\text{g/ml}$ DHA 处理的细胞核固缩最为明显,初步判定 DHA 引起的细胞死亡为凋亡。流式术检测(图 3)显示,5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ DHA 处理细胞的凋亡率分别为(25.1 \pm 2.8)%、(43.6 \pm 3.1)%、(68.9 \pm 2.6)% ,均高于对照组($P < 0.01$)。

2.3 ROS 抑制 DHA 引起的线粒体膜电位下降

如图 4 所示,20 $\mu\text{g/ml}$ DHA 能显著引起线粒体膜电位下降[(59.4 \pm 2.6)% vs (2.9 \pm 2.1)% , $P < 0.01$],而 ROS 的抑制剂 NAC 预处理细胞之后,线粒体膜电位下降与单药相比有所减轻[(38.4 \pm

2.1)% vs (59.4 \pm 2.6)% , $P < 0.01$],说明 ROS 参与并抑制了 DHA 诱导的线粒体膜电位下降。

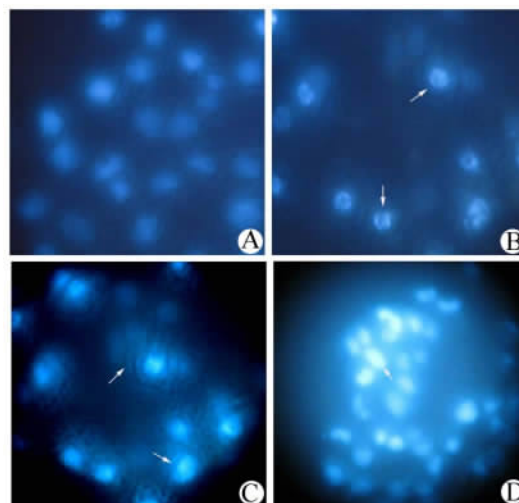


图 2 不同浓度 DHA 引起 Hut-78 细胞核形态的变化($\times 200$)

Fig. 2 Morphological features of Hut-78 cell's nucleus induced by different concentration of DHA($\times 200$)

A: Control; B: 5 $\mu\text{g/ml}$ DHA;

C: 10 $\mu\text{g/ml}$ DHA; D: 20 $\mu\text{g/ml}$ DHA

2.4 ROS 抑制 DHA 引起细胞色素 C 的释放

Western blotting 检测(图 5、6)显示,空白对照组细胞中的细胞色素 C (mito-cytochrome C)主要存在于线粒体上,而释放到细胞质里面的细胞色素 C (cyto-cytochrome C)很少。DHA 处理后,胞质中细胞色素 C 明显增多,而线粒体中显著减少,说明 DHA 导致细胞色素 C 释放增加。ROS 抑制剂 NAC 预处理后,线粒体细胞色素 C 释放明显减少,说明 ROS 显著抑制了 DHA 引起的细胞色素 C 释放。

3 讨论

青蒿素是由菊科植物黄花蒿的叶和花蕾中分离得的一种具有过氧桥结构的倍半萜内酯过氧化物^[11],原是一种抗疟特效药,但近来发现,青蒿素及其衍生物具有明显的抗肿瘤效果^[12]。DHA 的抗肿瘤研究逐渐成为研究热点之一,关于其抗肿瘤机制,现普遍认为与它的抗疟疾机制类似:过氧化桥能够跟铁离子反应形成自由基,然后作用于大分子和引起细胞凋亡^[13]。

外周 T 细胞淋巴瘤为血液系统肿瘤之一,逐年增长的发病率已受到格外关注。该淋巴瘤在既往 20 年中整个生存曲线无明显改观,其较少的病例及不均一的生物学特性和疾病本身的侵袭性、耐药性都是造成难以治愈的原因^[14]。因此,研究一种有效

药物是研究者们面临的一大挑战。近年来的治疗手段主要以化学药物治疗为主, 如吉西他滨、培美曲

塞、多柔比星等^[15-18]。用中药提取物来治疗外周 T 细胞淋巴瘤的研究相对较少。

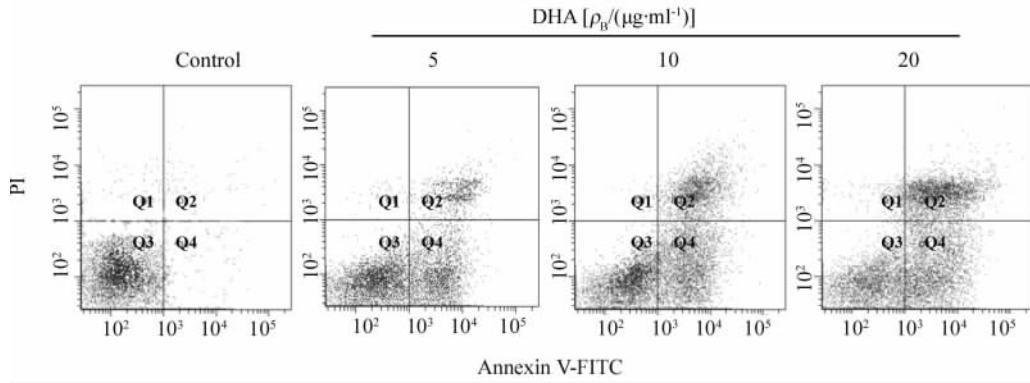


图 3 不同浓度 DHA 引起 Hut-78 细胞凋亡

Fig. 3 Hut-78 cell apoptosis induced by different concentrations of DHA

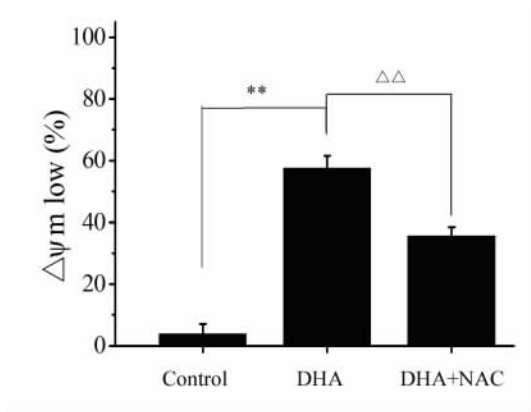


图 4 ROS 在 DHA 引起的细胞线粒体膜电位变化中的作用

Fig. 4 Effect of ROS on changes of mitochondrial membrane potential induced by DHA

** $P < 0.01$; $\Delta\Delta P < 0.01$

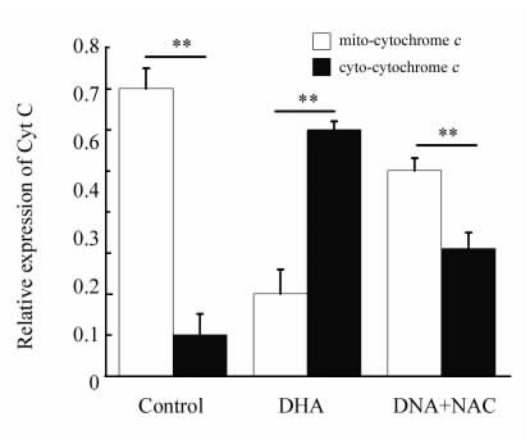


图 6 DHA 引起的细胞色素 C 释放

Fig. 6 Release of cytochrome C induced by DHA

** $P < 0.01$

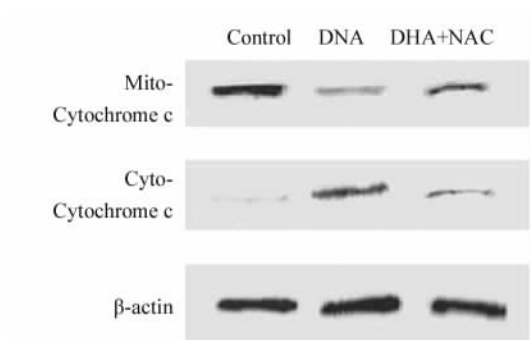


图 5 ROS 在 DHA 引起的细胞色素 C 释放中的作用

Fig. 5 Effect of ROS on release of cytochrome C induced by DHA

** $P < 0.01$

本研究用青蒿素的衍生物 DHA 作用于外周 T 细胞淋巴瘤细胞, 发现其能够以浓度依赖的方式抑制细胞的增殖, 并引起细胞凋亡。在 DHA 引起的细胞凋亡过程中, 线粒体参与了此过程并导致了线粒体膜电位下降, 而 ROS 能够明显抑制 DHA 引起的线粒体膜电位下降。此外, 本研究还证明了 DHA 能够诱导线粒体细胞色素 C 的释放, 而 ROS 参与了这样一个过程并明显可以抑制细胞色素 C 的释放。ROS 是细胞中能量产生的同时持续产生需氧代谢的副产品^[18-19], 在可承受的某一浓度范围内, ROS 可以诱导细胞进行胁迫应答, 并通过改变许多基因的表达来维持能量的代谢, 以保护细胞; 但是当超出细胞可承受的临界值后, ROS 便诱导线粒体膜的渗透性改变和细胞色素 C 的释放, 进而引起细胞凋

亡^[19]。Disbrow 等^[20]发现,DHA 在诱导宫颈癌细胞凋亡的过程中伴随产生大量的 ROS,激活了细胞凋亡通路,最终导致细胞凋亡。而本研究同样发现线粒体及 ROS 都参与了 DHA 诱导的凋亡,并且是 ROS 依赖性的细胞色素 C 释放导致的。

综上,DHA 能够明显抑制外周 T 细胞淋巴瘤 Hut-78 细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,其机制可能是 ROS 依赖的细胞色素 C 释放导致的细胞凋亡,为外周 T 细胞淋巴瘤的治疗研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] AU W, WEISENBURGER D D, INTRAGUMTORNCHAI T, et al. Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the international peripheral T-cell lymphoma project [J]. *Blood*, 2009, 113 (17): 3931-3937. DOI: 10.1182/blood-2008-10-185256.
- [2] TSIRIGOTIS P, LILIANE D, RESNICK I B, et al. Post-autologous stem cell transplantation administration of rituximab improves the outcome of patients with aggressive B cell non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Hematol*, 2010, 89(3): 263-272. DOI: 10.1007/s00277-009-0808-5.
- [3] LI J, LI P, HUA W, et al. Prognostic significance of Ki-67 antigen expression in extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(10): 1-8. DOI: 10.1007/s12032-014-0218-y.
- [4] FUJIWARA H, KAWADA H, MATSUSHITA K, et al. Case of a patient with progressive adult T-cell leukemia/lymphoma treated successfully by reduced-intensity conditioning stem cell transplantation from an HLA-incompatible related donor [J]. *Inter J Hematol*, 2005, 82(4): 357-361. DOI: 10.1532/ijh97.05047.
- [5] MALIK S M, LIU K, QIANG X, et al. Folutyn (pralatrexate injection) for the treatment of patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: US Food and Drug Administration drug approval summary [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(20): 4921-4927. DOI: 1078-0432.ccr-10-1214.
- [6] DONG M, HE X H, LIU P, et al. Gemcitabine-based combination regimen in patients with peripheral T-cell lymphoma [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 1-6. DOI: 10.3109/10799893.2011.586353.
- [7] KOVACIC P, SOMANATHAN R. Cell signaling and receptors with resorcinols and flavonoids: redox, reactive oxygen species, and physiological effects [J]. *J Recep Sig Transd Res*, 2011, 31(4): 265-270. DOI: 10.1007/s00580-012-1407-8.
- [8] NIKOLOVA G, MANCHEVA V. Analysis of the parameters of oxidative stress in patients with Parkinson's disease [J]. *Comp Clin Pathol*, 2013, 22(2): 151-155. DOI: 10.1371/journal.pone.0011792.
- [9] DEVUN F, WALTER L, BELLIERE J, et al. Ubiquinone ana-
- logs: a mitochondrial permeability transition pore-dependent pathway to selective cell death [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(7): e11792-e11792. DOI: 10.1186/1756-9966-33-8.
- [10] JIA G, KONG R, MA Z B, et al. The activation of c-Jun NH2-terminal kinase is required for dihydroartemisinin-induced autophagy in pancreatic cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(3): 1-10. DOI: 10.1007/s10886-014-0384-6.
- [11] JESSING K K, DUKE S O, CEDERGREEN N. Potential ecological roles of artemisinin produced by *Artemisia annua* L [J]. *J Chem Ecol*, 2014, 40(2): 100-117. DOI: 10.1007/s10886-014-0384-6.
- [12] ZHOU J Y, ZHU Y. Progress in antitumor effects of artemisinin and its derivatives [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 26(6): 975-981.
- [13] ZHANG C Z, PAN Y, CAO Y, et al. Histone deacetylase inhibitors facilitate dihydroartemisinin-induced apoptosis in liver cancer in vitro and in vivo [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e39870. DOI: 10.1371/journal.pone.0039870.
- [14] LI P, LI J, ZHANG X, et al. CD30 expression is a novel prognostic indicator in extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 1-8. DOI: 10.1186/1471-2407-14-890.
- [15] ERICSSON T, BLANK A, HAGENS C V, et al. Population pharmacokinetics of artesunate and dihydroartemisinin during long-term oral administration of artesunate to patients with metastatic breast cancer [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70(12): 1453-1463. DOI: 10.1007/s00228-014-1754-2.
- [16] ARKENAU H T, CHONG G, CUNINGHAM D, et al. Gemcitabine, cisplatin and methylprednisolone for the treatment of patients with peripheral T-cell lymphoma: the royal marsden hospital experience [J]. *Haematologica*, 2007, 92(2): 271-272. DOI: 10.1007/s00277-014-2121-1. DOI: 10.3324/haematol.10737.
- [17] PELLEGRINI C, STEFONI V, CASADEI B, et al. Long-term outcome of patients with advanced-stage cutaneous T cell lymphoma treated with gemcitabine [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(11): 1853-1857. DOI: 10.1007/s00277-014-2121-1.
- [18] REUNOV A V. Plant peroxisomes: the role in metabolism of reactive oxygen species and the processes they mediate [J]. *Biol Bulletin Rev*, 2014, 4(4): 311-322. DOI: 10.1134/s2079086414040082.
- [19] TEPP K, MADO K, VARIKMAA M, et al. The role of tubulin in the mitochondrial metabolism and arrangement in muscle cells [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2014, 46(5): 421-434. DOI: 10.1007/s10863-014-9579-3.
- [20] DISBROW G L, BAEGE A C, KIERPIEC K A, et al. Dihydroartemisinin is cytotoxic to papillomavirus-expressing epithelial cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10854-10861. DOI: 10.1158/0008-5472.can-05-1216.

[收稿日期] 2015 - 09 - 07

[修回日期] 2015 - 12 - 04

[本文编辑] 黄静怡